

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平10-191961

(43)公開日 平成10年(1998)7月28日

(51)Int.Cl.⁹

識別記号

F I

C 1 2 M 3/00

C 1 2 M 3/00

A

C 1 2 N 5/06

C 1 2 N 5/00

E

審査請求 有 請求項の数12 O L (全 7 頁)

(21)出願番号 特願平9-160316

(22)出願日 平成9年(1997)6月17日

(31)優先権主張番号 8 5 1 0 7 3 4 4

(32)優先日 1996年6月18日

(33)優先権主張国 台湾 (TW)

(71)出願人 597085671

廖 明一

台湾、台北市南港区昆陽街161号

(72)発明者 廖 明一

台湾、台北市南港区昆陽街161号

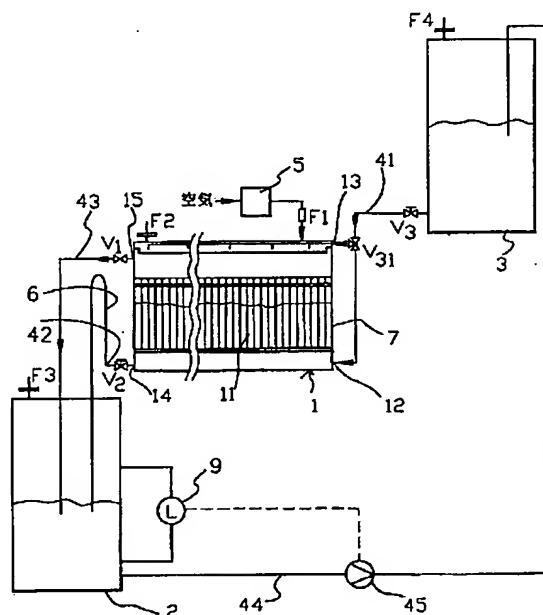
(74)代理人 弁理士 鈴江 武彦 (外4名)

(54)【発明の名称】 細胞の培養方法及び培養装置

(57)【要約】

【課題】代謝物除去及び培地交換が容易で、細胞附着基材表面が培地に浸漬または露出され、培地による養分の供給及び新鮮気体の供給が容易で高密度細胞に適用出来、高剪断力が発生せずに培地により細胞成長の為の溶存酸素を十分供給し、細胞基材からの細胞の不意な剥離を避けることができ、制御が容易で生産規模拡大が容易である細胞の培養方法及び培養装置を提供することである。

【解決手段】出入手段14;13,12を有し細胞附着用基材が設けられた細胞培養室11と、出入手段を介し培地を細胞培養室に通過させる循環ポンプ45と、を備えた細胞培養装置においては:基材が細胞培養室で動かない状態の間に、循環ポンプが、基材表面に対する培地のレベルを基材の上端縁高さより高いレベルと下端縁高さより低いレベルとの間で上げ・下げ操作し、上記低レベルに下がると培地を供給し、上記高レベルに上がると培地を排出する。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 出手段(14)及び入り手段(13, 12)を有する細胞培養室(11)と、細胞培養室(11)内に設けられている細胞付着用の複数の基材(7)と、出手段(14)及び入り手段(13, 12)と連通され培地を出手段(14)及び入り手段(13, 12)をへて細胞培養室(11)に循環させる循環手段(2, 3, V3, V2, 6, 8, 44, 45)と、を備えた層細胞の培養装置において、前記循環手段が、基材(7)を細胞培養室(11)に対し動かさない状態で、基材(7)の表面に対する培地のレベルを基材(7)の上端縁高さ(h2)より高いレベルと下端縁高さ(h1)より低いレベルとの間に上げ・下げ操作をし、且つ、培地のレベルが前記低いレベルに下がると入り手段(12, 13)を経由して培地を供給し、また、培地のレベルが前記高いレベルに上がると出手段(14)を経由して培地を排出することができるように構成されている、ことを特徴とする細胞の培養装置。

【請求項2】 前記循環手段は、出手段(14)と連通し細胞培養室(11)の底部より低い所に置かれている第1の貯槽(2)を備えている、ことを特徴とする請求項1に記載の細胞の培養装置。

【請求項3】 前記循環手段は、細胞培養室(11)の上流側で細胞培養室(11)の天井よりも高い位置に置かれている第2の貯槽(3)を備えている、ことを特徴とする請求項2に記載の細胞の培養装置。

【請求項4】 前記循環手段は、第1の貯槽(2)と第2の貯槽(3)との間に設けられているポンプ手段(45)を備えている、ことを特徴とする請求項3に記載の細胞の培養装置。

【請求項5】 前記循環手段は、出手段(14)及び第1の貯槽(2)の夫々と連通し培地のレベルが前記高いレベルに上がると吸い上げ作用を行なうサイホン手段を備えている、ことを特徴とする請求項4に記載の細胞の培養装置。

【請求項6】 前記循環手段は、培地の流出量を制御するよう出手段(14)に連通して設置されている第1の制御弁(V2)と、培地の流入量を制御するよう入り手段(12, 13)に連通して設置されている第2の制御弁(V3)と、を備えている、ことを特徴とする請求項5に記載の細胞の培養装置。

【請求項7】 前記循環手段は、基材(7)の天辺より高い箇所と細胞培養室(11)と連通したあふれ管(43)と、このあふれ管(43)に設けられているあふれ弁(V1)と、を備えている、ことを特徴とする請求項6に記載の細胞の培養装置。

【請求項8】 前記循環手段は、第1の貯槽(2)中の培地の表面のレベルを測定する培地表面レベル測定手段(9)を備えている、

ことを特徴とする請求項7に記載の細胞の培養装置。

【請求項9】 前記入り手段は、細胞培養室(11)の天井に近い箇所に設けられた第1の入口(13)と、細胞培養室(11)の底部に近い箇所に設けられた第2の入口(12)と、を備えている、

ことを特徴とする請求項8に記載の細胞の培養装置。

【請求項10】 細胞培養室(11)内の基材(7)の上方または下方に設けられて細胞培養室(11)に流れ込む培地を均一に分配する培地均一分配手段(8)を更に備えている、

ことを特徴とする請求項9に記載の細胞の培養装置。

【請求項11】 細胞培養室(11)の上部から細胞培養室(11)に気体を供給する気体供給手段(5)を更に備えている、

ことを特徴とする請求項10に記載の細胞の培養装置。

【請求項12】 (a) 出手段(14)及び入り手段(13, 12)と、細胞付着のための基材(7)と、を有する細胞培養室(11)を設置し；

(b) 細胞培養室(11)に培地を供給して基材(7)に細胞を付着させ；

(c) 基材(7)の表面に細胞を成長させながら基材(7)を細胞培養室(11)に対し動かさない状態で、出手段(14)及び入り手段(13, 12)を経由して培地を循環させると共に、基材(7)の表面に対する培地のレベルを基材(7)の上端縁高さ(h2)より高いレベルと下端縁高さ(h1)より低いレベルとの間で上げ下げ操作し；

(d) 培地のレベルが前記高いレベルに上がると出手段(14)を経由して培地を流出させるように制御し；

(e) 培地のレベルが前記低いレベルに下がると入り手段(12, 13)を経由して培地を流入させるように制御する；ことを特徴とする細胞の培養方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】この発明は動物細胞の培養方法及び培養装置に関し、特に、足場依存性単一層細胞の培養方法及び培養装置に関する。

【0002】

【従来の技術】動物細胞由来薬品の需要増加に伴って動物細胞の培養方法の開発が製薬業界の必須不可欠な仕事になっている。そして、ほ乳類動物細胞などの多くの動物細胞を培養する時には、細胞が培地に懸濁されて成長できないため、足場としての基材に細胞を付着固定させなければならない。このような足場依存性動物細胞の培養方法は今まで多く開発されている。例えば、組織培養器、ローラ瓶式、細胞培養器、攪拌槽におけるマイクロキャリア、中空繊維及び陶磁器方式などがそうである。

【0003】[Wei-Shou Hu et al, "Animal Cell Bioreactors—Recent Advances and Chall

enges to Scale-up" The Canadian Journal of Chemical Engineering; "Specialized Techniques" Volume 69, April, 1991, page 409-420; "Specialized Techniques", Culture of Animal Cells, Chapter 23, pages 371-377].

【0004】動物細胞培養の過程においては、酸素などの気体及び養素を十分に供給するのがその基本要求である。気体または養素が十分に供給されなければ、細胞の成長が阻害される。そして、代謝物量のレベルの制御も要求される。何故ならば培地における代謝物濃度が高過ぎると細胞の成長が阻害されるからである。

【0005】前記ローラ瓶式はバス型で、培地の循環系統がついていない。この方式は、培地を収容しフレーム上に支承されて転がる瓶を備えている。通常は、この瓶の一つに瓶の容量の $1/10 \sim 1/5$ の倍地を入れ、瓶を回転させながら細胞を瓶の内壁に付着させて成長させると共に、回転時は、培地に浸されていない瓶内壁表面に形成される薄膜によって気相と液相との間の気体交換を促進させ、培地中の溶存酸素量を増加させる。従って、この方式によっては、たとえ細胞の密度が高くなっても、酸素など気体の供給を十分に受けることができ、また、瓶内壁への細胞の付着表面積が増加し、且つ、緩やかな攪拌効果がある。そして、この方式においては、ピペットまたはぜん動型ポンプなどの注入装置や分配装置によって新鮮な培地を添加することもできる。

【0006】しかしながら、この方式によっては、pH及び溶存酸素を制御することができない。その上、培地の循環系統がついていないため、培地を頻繁に交換することにより有害性代謝物の排除及び養素の補足をしなければならないので、手間がかかる。そして、量産には多くの瓶をつかわなければならないので、手間がもっとかかり、均一な品質も得難い。従ってその応用範囲には限りがある。

【0007】培地循環系統がついている細胞培養方式は培地の補足及び代謝物の排除に有利である。このような方式においては、細胞は常に培地に浸漬されており、且つ、培地の循環速度が制御されて養素及び溶存酸素が十分に供給される。

【0008】マイクロキャリア方式も循環型であり、量産の拡大は容易にすることができるが、コストが高いのみならず、細胞はマイクロ基材から分離しやすいので、特に剪断力が大きい場合には、操作が不便である。

【0009】もう一つの循環型培養方式は中空繊維または陶磁器方式などのプラグ流れのバイオリクターである。中空繊維方式においては、培地は高い流速で繊維の内腔を通り、極一部しか繊維膜に浸透しない。この中空

繊維方式は、培養密度及び効率が高い方式であるが、小分子量の養素の供給及び代謝物の排除は、通常、膜を横切った濃度勾配に依存する拡散によって達成されるので、溶存酸素及び養素は中空繊維の長さや厚さの増加に伴って不足する。従って、中空繊維方式では、やはり細胞の量産には難しい。

【0010】そして、陶磁器方式においては、多孔性セラミックシリンダの通路に細胞が接種されており、且つ、培地が養素を供給しながら代謝物を除去するように前記通路を通過する。この時、溶存酸素量を増加させるには、ポンプで培地を循環させる。しかしながら、十分な溶存酸素量を供給するために培地の循環速度を増加させると、この培地の循環速度の増加により細胞が足場（固定表面）から剥離し生産性に悪影響をきたす可能性がある。

【0011】

【発明が解決しようとする課題】この発明は上記事情の下でなされ、この発明の目的は、代謝物の除去及び培地の交換が容易に行なえ、且つ、細胞の足場表面が培地から浮上し、培地の薄膜と気体との間の気体交換が容易に行なうことが出来て、たとえ高密度細胞においても、酸素不足の問題を解決することができる、細胞の培養方法及び培養装置を提供することである。

【0012】この発明はまた、高剪断力が発生することなく、培地によって細胞の成長のための溶存酸素を十分に供給することができる、細胞の培養方法及び培養装置を提供することを目的としている。

【0013】さらにまた、この発明は、容易に制御でき、且つ、生産規模のスケールアップが容易な、細胞の培養方法及び培養装置を提供することを目的としている。

【0014】さらにこの発明は、細胞の付着表面積が広く、且つ、培養基材からの細胞の剥離を容易に行なえる、細胞の培養方法及び培養装置を提供することを目的としている。

【0015】

【課題を解決するための手段】本願の発明は上記目的を達成するために、この発明の細胞の培養装置では、出手段及び入り手段を有する細胞培養室と、細胞培養室内に設けられている細胞付着用の基材と、出手段及び入り手段と連通され培地を出手段及び入り手段をへて細胞培養室に循環させる循環手段と、を備えた細胞の培養装置において、前期循環手段が、基材が細胞培養室に対し動かない状態で、基材の表面に対する培地のレベルを基材の上端縁高さより高いレベルと下端縁高さより低いレベルとの間で上げ・下げ操作し、且つ、培地のレベルが前記低いレベルに下がると入り手段を経由して培地を供給し、また、培地のレベルが前記高いレベルに上がると出手段を経由して培地を排出することができるように構成されている。

【0016】前記循環手段は、好ましくは、出手段と連通し細胞培養室の底部より低い所に置かれている第1の貯槽と、細胞培養室の上流側で細胞培養室の天井より高い位置に置かれている第2の貯槽と、第1の貯槽と第2の貯槽との間に設けられているポンプ手段と、出手段及び第1の貯槽の夫々と連通し培地のレベルが前記高いレベルに上がると吸い上げ作用を行なうサイホン手段と、培地の流出量を制御するよう出手段に連通して設置されている第1の制御弁と、培地の流入量を制御するよう入り手段に連通して設置されている第2の制御弁と、基材の天辺より高い箇所から細胞培養室と連通したあふれ管と、あふれ管に設けられているあふれ弁と、第1の貯槽中の培地の表面のレベルを測定する培地表面レベル測定手段などを必要に応じて備えている。

【0017】また、入り手段は、好ましくは、細胞培養室の天井に近い箇所に設けられた第1の入口と、細胞培養室の底部に近い箇所に設けられた第2の入口と、を備えている。そしてまた、本願の細胞の培養装置は、好ましくは、細胞培養室内の基材の上方または下方に設けられて細胞培養室に流れ込む培地を均一に分配する培地均一分配手段と、細胞培養室の上部から細胞培養室に気体を供給する気体供給手段と、を更に備えている。

【0018】そして、上述した本願の発明の目的を達成する為に、本願発明の細胞の培養方法では：(a)．出手段及び入り手段と、細胞付着のための基材と、を有する細胞培養室を設置し；(b)．細胞培養室に培地を供給して基材に細胞を付着させ；(c)．基材の表面に細胞を成長させながら基材を細胞培養室に対し動かさない状態で、出手段及び入り手段を経由して培地を循環させると共に、基材の表面に対する培地のレベルを基材の上端縁高さより高いレベルと下端縁高さより低いレベルとの間で上げ下げ操作し；(d)．培地のレベルが前記高いレベルに上がると出手段を経由して培地を流出させるように制御し；培地のレベルが前記低いレベルに下がると入り手段を経由して培地を流入させるように制御する；ことを特徴としている。

【0019】

【発明の実施の形態】以下、添付の図面を参照しながら本発明の細胞培養方法及び細胞培養装置の1つの実施の形態を説明する。

【0020】図1、図2及び図3に示すように、本発明の細胞培養装置はまず容器1を備えている。この容器1は、培地を収容する細胞培養室11と、培地を送入するための上入口13及び下入口12を備えている入り手段と、培地を排出するための出手段14と、培地が溢れる際それを排出するためのあふれ口15などを備えている。細胞培養室11より下方側に第1の貯槽2が設けられ、上方側に第2の貯槽3が設けられている。

【0021】細胞培養室11内に、細胞の為の足場(固定表面)を提供するための基材7が設けられている。こ

の基材7は、この実施の態様において、複数の直立した平板状の基板71を逐一に対面するように配列してなるが、その形態は図示の例に限らるものではない。例えば、柵状の基板からなるもの、または、詰め物を細胞付着用材料として採用するものも使用される。

【0022】この実施の形態においては、培地を循環させるための循環手段が配設されている。この循環手段は、供給管41と、排出管42と、あふれ管43と、回流管44とからなる。供給管41は上入口12、下入口13及び第2の貯槽3と連通しており、排出管42は出手段14及び第1の貯槽2と連通しており、そして、あふれ管43はあふれ口15と第1の貯槽2との間に延在している。回流管44はポンプ手段45を介して第1の貯槽2と第2の貯槽3とを連通させて配設されている。即ち、ポンプ手段45により、培地を第1の貯槽2から第2の貯槽3に移送することができる。

【0023】図1及び図2に示す弁V1、V2、V3、V31は、あふれ管43、排出管42及び供給管41の夫々における培地の流量を制御するための制御弁である。弁31は三方弁であり、それにより、培地は操作に応じて上入口12または下入口13を経由して細胞培養室11に導入される。フィルターF1、F2は細胞培養室11のために設けられ、そして、フィルターF3、F4は第1の貯槽2及び第2の貯槽3のために設けられている。フィルターF1を経由して新鮮な空気がエアポンプ5によって細胞培養室11に供給される。また、第1の貯槽2には、その中の培地のレベルを測定し制御するためのレベルコントローラ9が設けられている。第1の貯槽2内における培地が所定のレベルに上がると、このレベルコントローラ9はポンプ手段45を作動して培地を第2貯槽3へ移送することができる。

【0024】参照符号6はサイホン手段を指摘しており、倒置したU字形の管からなる。サイホン手段6の一端部は第1の貯槽2内の培地に挿入され、他端部は排出管42と連結されている。このサイホン手段6の高さは、細胞培養室11における培地の表面のレベルが基板71の上端縁高さh2より高い所定のレベルに上がると、培地を吸い上げて、サイホン手段6を経由し、第1の貯槽2に移送することができる程度に設定されている。

【0025】この実施の形態においては、また、細胞培養室11内の複数の基板71の上方または下方に設けられて細胞培養室11に流れ込む培地を均一に分配する培地均一分配手段8を備えている。図1及び2に示す例では培地均一分配手段8は上方に設けられているので、培地はそれにより分配されて複数の基板71に均一に落下することができる。この培地均一分配手段8は複数の分配開口が開けられており、且つ、その一端が上入口13と連結されている分配管81と、底面に複数の開口が設けられて分配管81の分配開口から落下する培地を一時

的に受けて前記底面の複数の開口を通して複数の基板71に均一に落下させるトレー82とからなる。もちろん、図に示されていないが、トレー82に代えてスプレーを使用しても良い。

【0026】本発明の細胞培養方法の操作は細胞付着工程から始める。この工程においては、まず、弁V3を制御し、自重または差圧により、培地を第2の貯槽3から細胞培養室11へ所定流量で導入する。この時、あふれ口15に取り付けられている弁V1が開けられたまま保持されるので、細胞培養室11内における培地をh4以上のレベルに上げて複数の基板71の全体を浸漬することができる。あふれ口15から溢れてくる培地はあふれ管43を経由して自重または差圧により第1の貯槽2に流れ込む。第1の貯槽2における培地のレベルはレベルコントローラ9に制御されて所定のレベルに維持されている。即ち、第1の貯槽2におけるレベルが所定の高いレベルに上がると、レベルコントローラ9はポンプ手段45を作動して培地を第2の貯槽3に移送し、また、所定の低いレベルに下がると、ポンプを停止させることができる。そうすると、培地は細胞培養室11、第1の貯槽2、そして第2の貯槽3を通してから再び細胞培養室11へと循環することができる。循環の時間は約30分間であるが、細胞付着の具合をみて調整することができる。

【0027】基板71への細胞付着が完成すれば、弁V3を開けたまま、あふれ弁V1を閉じ、弁V2を開ける。この時、細胞培養室11内の培地のレベルはサイホン手段6の高さよりずっと高いので、培地はサイホン作

$$U1 = f1 / W1$$

である。

【0030】 $h1 < h_x < h2$ の場合、培地レベルの上

$$U1 = f1 / W(1 - Nd)$$

(ただし、式中で、Nは基板数を示し、dは各基板の厚さを示す。)である。

【0031】そして、サイホン手段6が働いて培地レベルが下がる時、管41及び43それぞれにある流量f

$$U2 = (f2 - f1) / W1 \quad (3)$$

である。

【0032】 $h1 < h_x < h2$ の場合、培地レベルの降

$$U2 = (f2 - f1) / W(1 - Nd) \quad (4)$$

である。

【0033】従って、培地レベルを0からh3まで上が

$$t_1 = W[(h1 + h2 + h3)L + (h2 - h1)(1 - Nd)] / f1 \quad (5)$$

【0035】培地レベルをh3から0まで下がる時間は下式で計算される。

$$t_2 = W[(h1 + h3 - h2) + (h2 - h1)(1 - Nd)] / (f2 - f1) \quad (6)$$

【0037】従って、レベルが高レベルから下がり始める時点から再び上がって該高レベルに戻った時点までの

用により、出手段14を経由して第1の貯槽2に導入される。そのため、細胞培養室11内にある培地のレベルが段々下がると共に、基板71の足場面は、面上に薄膜状の培地だけが残ったまま露出する。上記のように、基板71の足場面を培地に対して交換的に浸漬したり露出したりするように操作する。細胞が基板71の表面を十分に被覆した後に前記操作を停止する。1循環の操作は約30分間であることが好ましい。1循環の時間、即ちレベルが高いレベルから下がり始める時点から再び上がって該高いレベルに戻った時点までの時間は、下記のように、管41及び43のそれぞれを通して流れる一定の流量f1及びf2によって決定することができる。

【0028】図2に示すh1及びh2のそれぞれは細胞培養室11の底部から基板71の下端縁までの高さ、及び、前記底部から基板71の上端縁までの高さ、を表わす。そして、h3は前記底部からのサイホン手段6の高さであり、h4は前記底部からのあふれ口15の高さであり、h_xは前記底部からの培地レベルの面の高さである。また、図3に示すWは基板71の幅(細胞培養室11の幅に相当)であり、Lは複数の基板71からなる基材7の長さ(細胞培養室11の長さに相当)である。培地を細胞培養室11に送入して細胞培養室11内の培地を低レベルからサイホン手段6の高さh3までに段々上げる時、サイホン手段6が働かないので、管43を通して流れる培地の流量f2は0である。

【0029】その時、 $0 < h_x < h1$ または $h2 < h_x < h3$ の場合、培地レベルの上昇速率が下式に示される。即ち、

$$(1)$$

昇速度が下式に示される。即ち、

$$(2)$$

1、f2を常数と仮設すれば、 $0 < h_x < h1$ または $h2 < h_x < h3$ の場合、培地レベルの降下速度が下式に示される。即ち、

$$(3)$$

下速度が下式に示される。即ち、

$$(4)$$

る時間は下式で計算される。

【0034】

【0036】

1循環の時間は、下式で決定される。

【0038】

$$t_p = t_1 + t_2$$

【0039】

【発明の効果】上述した実施の形態から分かるように、この発明の細胞培養方法及び細胞培養装置によれば、培地循環機構により、代謝物の除去及び培地の交換が容易に行なえ、且つ、細胞の足場表面が培地に浸漬されたり露出されたりし、培地による養分の供給及び新鮮な気体の供給が容易に行なえるので、高密度細胞にも適用することができる。また、高剪断力を発生させないまま培地によって細胞の成長に必要な溶存酸素を十分に供給することができるので、基板からの細胞の不意な剥離を避けることができる。そして、容易に制御でき、且つ、容易に設計ないしスケールアップすることができるので、量産に適用出来る。また、細胞の付着表面積が広く、且つ、培養基材からの細胞の剥離が容易に行なえるので生産コストを下げる事ができる。なお、上述した実施の形態は、培地の表面のレベルを制御して本発明を実用化するが、基材を上げ下げ操作する方式で実用化することも当然である。

【図面の簡単な説明】

【図1】足場依存性単一層細胞の為の本発明の細胞培養装置の1つの実施の形態の全体の構成を概略的に示す図である。

【図2】図1に示されている細胞培養室の構成を拡大してより詳細に示す図である。

【図3】図1に示されている細胞培養室中の基材を拡大

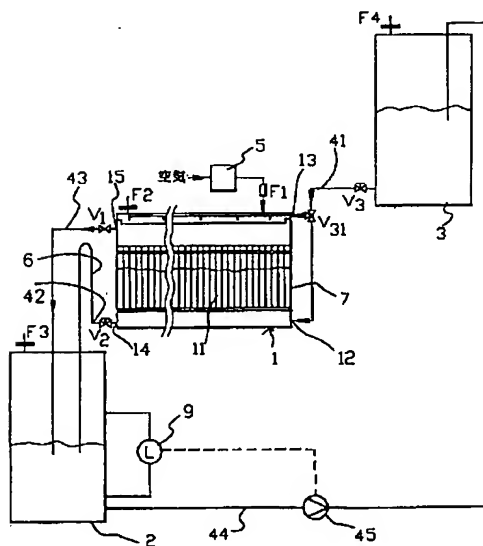
(7)

して示す斜視図である。

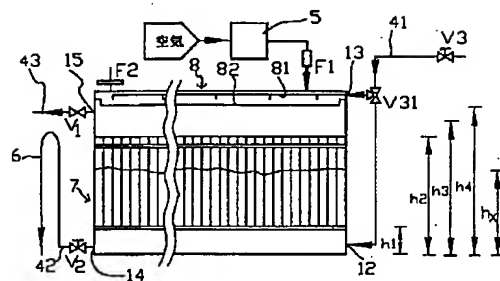
【符号の説明】

- 12 上入口（入り手段）
- 13 下入口（入り手段）
- 14 出手段
- 2 第1の貯槽（循環手段）
- 3 第2の貯槽（循環手段）
- V1 あふれ弁
- V2 第1の制御弁（循環手段）
- V3 第2の制御弁（循環手段）
- 5 気体供給手段
- 6 サイホン手段（循環手段）
- 7 基材
- 8 分配手段（循環手段）
- 11 細胞培養室
- 12 上入口（入り手段）
- 13 下入口（入り手段）
- 14: 13, 12 出入り手段
- 43 あふれ管
- 44 回流管（循環手段）
- 45 ポンプ手段（循環手段）
- 71 基板
- h1 下端縁高さ
- h2 上端縁高さ

【図1】



【図2】



(7)

特開平10-191961

【図3】

